

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19363

研究課題名(和文)植物の細胞分裂期における1細胞オミックス解析

研究課題名(英文)Single cell omics analysis during plant cell division

研究代表者

栗原 恵美子 (Emiko, Kurihara)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：90639585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：分裂期の細胞動態は時空間的に精巧に制御されており、それらは分子レベルでも厳密な制御がなされているはずであるが、これら現象に対応するオミックス情報はほとんど不明であった。本研究課題ではまず染色体の状態から分裂前、中、後、終期を判断し、目的の細胞のみを取得し、オミックス解析を行う手法を確立した。分裂期の各時期における詳細な代謝変動および遺伝子発現を明らかにした。その結果、前期、中期、後期、終期の間においても明白な代謝物の変動および遺伝子の発現があることを見出した。さらに、時期特異的に蓄積している代謝物質、脂質の傾向を解析することにより前、中、後、終期の特徴を抽出することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂は生命を受け継ぎ、維持するために必須の過程である。本研究では目的の染色体状態のみの細胞をマイクロマニピレーターによりマニュアルで採取し、オミックス解析を行った。それにより、今まで明らかではなかった分裂期の進行過程における代謝物質および遺伝子の蓄積の情報を網羅的に明らかにした。動植物を通して初めて、分裂期の前、中、後、終期の表現型に対応した、分子情報を明らかにし、さらに分裂期の細かな時期の特徴を新知見として明らかにしたことが学術的な意義である。また、細胞分裂の過程を明らかにすることは植物においてはバイオマスの増加にもつながる必須な情報であり、社会的に貢献しうる情報を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Despite an important process of maintaining life that ensures that genetic information is distributed to daughter cells without mistake in the division period, it is completely unknown the comprehensive molecular information based on this progression. We separate mitosis based on the chromosomal condition in detail and isolate single cell in specific phase, successfully reveal strict metabolite fluctuation in the mitosis by performing single-cell metabolome and transcriptome analysis. As a result, there was obvious metabolite fluctuation and gene expression among pro-, meta-, ana- and telo-phase. Furthermore, we extract the feature of each phase by analyzing the tendency of the phase-specific accumulation of metabolites and lipids.

研究分野：植物細胞生物学

キーワード：分裂期 シングルセル解析 タバコBY-2細胞 メタボローム トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂期は、S 期に複製した 2 組の姉妹染色分体を、2 つの娘細胞に正確に均等分配する過程がある。ここで異常がおこると、生命を維持することができなくなるため、ミスの許されない非常に重要な過程であるといえる。植物細胞は両極に分かれた娘核の間に細胞板を形成することにより細胞分裂する。細胞の周囲を強固な細胞壁に囲まれている植物にとって、細胞板による正常な分裂面の挿入は染色体や細胞質成分を正確に均等分配するのみならず、植物の形態形成を考える上でも重要である。これまでに、顕微鏡を用いた解析により細胞板形成の過程とそれに関わる細胞骨格や小胞のダイナミックな動態が明らかにされてきた。それらは分裂期を通して時空間的に精巧に制御されているため、その基盤にある分子レベルにおいても厳密な制御がなされているはずである。しかしながら、これら現象に対応する細かな時間軸でのオミックス情報はほとんど不明であった。その理由としては、分裂期内の進行においては完全な同調ができないため、バルク細胞を対象にした解析ではかなりの割合で他の細胞状態(他の現象)を巻き込んでしまい、高精度な分離ができないという点あげられる。よって、目的の状態のみの細胞を取得する方法と、それに付随して、植物細胞 1 細胞に対する解析手法の確立する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では顕微鏡を通して観察される細胞分裂過程について、細胞の挙動を裏打ちする(構成要素となっている)オミックス情報を明らかにすることを目的とする。具体的には目的の分裂期状態に対応する 1 細胞の取得を行い、それに対する 1 細胞オミックス解析を行う。取得したデータを解析することにより、植物細胞の分裂期における分子レベルでの特徴を抽出する。その結果により、植物の分裂機構の一端を明らかにすることを試みる。

## 3. 研究の方法

分裂期の細胞の細かな状態は染色体の状態により判断される。顕微鏡による染色体の動態に基づいて M 期はさらに、前期・中期・後期・終期に分けられる。染色体凝縮の起こっている前期・染色体が赤道面に並ぶ中期・染色体が分離している後期・染色体分体が脱凝縮する時期が終期にあたる。細胞骨格、小胞などオルガネラの動態についても、染色体の状態に並行して、詳細に観察されている。そこで本研究課題では、M 期の細かな時期(前、中、後、終期)を特定するために、核(染色体)を可視化したタバコ BY-2 細胞(BY-HR 細胞; BY-2 cells expressing Histon2B-RFP)を樹立した。蛍光顕微鏡下においてリアルタイムベースで観察しながら、染色体の状態をもとに、M 期の前期、中期、後期、終期に対応するプロトプラスト 1 細胞のみをマイクロマニピレーターで取得した。次に取得した各時期の 1 細胞について 1 細胞トランスクリプトーム解析および 1 細胞メタボローム解析を行った。トランスクリプトームについては 1 細胞専用のキットを使用し cDNA 合成を行い、Hiseq (illumina)によりシーケンシングを行った。代謝物質の変遷については 1 細胞をナノスプレーチップ内にサンプリングし、質量分析計(nanoESI イオン源、LTQ-Orbitrap XL)に取り付け、測定を行った。メタボローム解析については、RIKEN QBiC の Ahmed Ali 博士の協力のもと測定し、解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) シングルセル解析実験系の確立

通常の BY-HR 細胞にはガラスニードルが刺さらなかったため、確実かつ迅速に 1 細胞を取得する方法として、細胞壁を除去するプロトプラスト化を行った。そして、細胞に刺すのではなく直径 10 $\mu$ m のガラスキャピラリーで細胞全体を吸引することによりサンプリングを行った。

## (2) M 期における

### シングルセルトランスクリプトーム解析

1 細胞 cDNA の合成: 1 細胞から cDNA を合成する。バイオアナライザで cDNA のクオリティーチェックを行い、ピークの波形が良いものをシーケンス解析のサンプルとする。

プロトプラスト化から 1 時間以上経過して取得した細胞から合成した cDNA はバイオアナライザで確認した波形が乱れていたため、サンプルはプロトプラスト化 1 時間以内に取得することとした。

NGS シークエンス解析: HiSeq を用いて cDNA をシーケンスし、遺伝子発現を解析する。前期、中期、後期、終期それぞれについて 3 細胞以上のデータを取得した。リードをマッピングし、細胞のフィルタリングとクオリティーチェックをした。その後、遺伝子の蓄積量のノーマライズを行い、それに対して、主成分分析を行った。その結果、遺伝子の蓄積情報により前期、中期、後期、終期を分離できた(Fig. 1)。さらにサンプル間で t-test をを行い FPKM の値が  $p\text{-value} < 0.05$ 、10 倍以上蓄積に変化があることを条件にすると、前期 42、中期 13、後期 49、終期 83 個の時期特異的な蓄積をする遺伝子を検出した。次に、McMichael and Bednarek (2013) *New Phytologist* を参考にし、細胞質分裂に関連する遺伝子としてすでに知られているもので、FPKM が 10 倍以上、 $p\text{-value} < 0.05$  のものをリストアップした。その中でも今回は特定の時期にのみ特異的に蓄積する遺伝子に着目すると、細胞骨格関連遺伝子、膜ダイナミクス関連遺伝子ともに 5 遺伝子があり、例として終期特異的に発現のあるものとして細胞骨格関連遺伝子 *Kin12a* や膜ダイナミクス関連遺伝子 *CESA/RSWI* が検出された。

## (3) M 期におけるシングルセルメタボローム解析

サンプルの取得は専用の植物 MS 用ナノスプレーチップ(HUMANIX)で細胞の全内容物を搾取した。取得した細胞をナノスプレーチップごと Orbitrap マススペクトリー装置にセットし、全代謝物データを得た。ポジティブモード、ネガティブモード、双方により代謝物を検出した。ブランクは細胞をプロトプラスト化した時の酵素液とした。得られた代謝物質について PCA を行った結果、両モードにおいて、前期、中期、後期、終期、それぞれの成分情報をもとに分離することができた(Fig. 2)。さらに前期、中期、後期、終期の時期特異的に高い代謝物質の検出を行った。 $P < 0.05$ 、Fold change  $> 10$  で閾値を設定した結果、ポジティブモードでは前期 74、中期 635、後期 625、終期 196 個、ネガティブモードでは前期 84、中期 100、後期 359、終期 125 個の時期特異的な代謝物質がリストアップされた。それらの中でも特に、時期特異的に蓄積している脂質に着目した。後期、終期になると時期特異的に検出される脂質の数が著しく増加した。

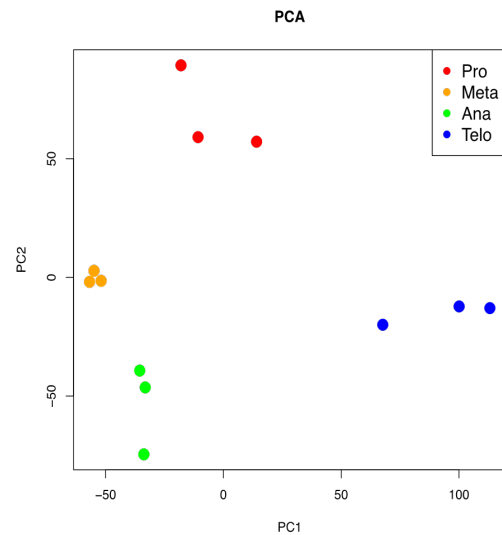


Fig.1 分裂期の蓄積している遺伝子における主成分分析(PCA)

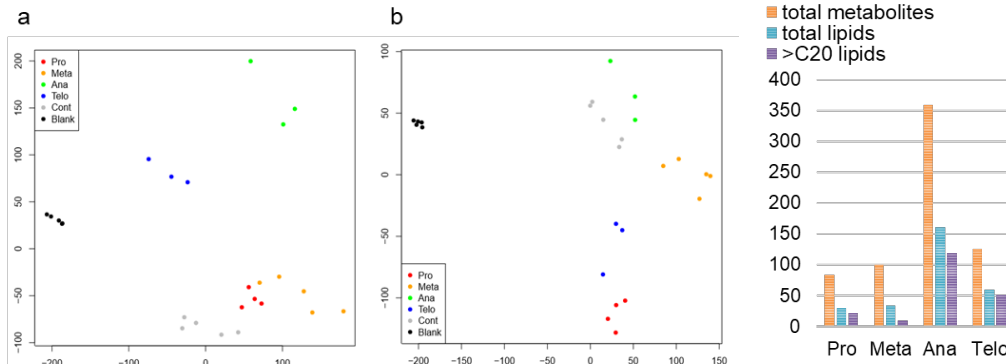


Fig.2 分裂期の全代謝物質における主成分分析(PCA)  
 a. Positive mode, b. negative mode  
 Pro:前期, Meta:中期, Ana: 後期, Telo: 終期, Cont: 細胞を含まない培地

Fig.3 時期特異的に蓄積する代謝物質および脂質の数  
 m/zについてP<0.05であり、他の時期と比較して10倍以上高く蓄積しているものについてカウントした。

また、その内訳としては C20 以上の極長鎖脂肪酸 (VLCFA; Very-long-Chain fatty acid) が 7 割以上を占めていた(Fig. 3)。Bach et al., (2011) Journal of Cell Science において、VLCFA 減少する変異体では細胞板の形成速度が遅いことが報告されており、今回、シングルセルレベルでも細胞板形成時期である後期、終期で VLCFA が顕著に蓄積することがわかり、VLCFA が細胞板形成にも関連することが予測された。また、蓄積している代謝物質および脂質の m/z の大きさの分布とピークの数から前、中、後、終期の特徴的なパターンを抽出した。以上の結果から、細胞分裂期において細胞の表現型の変遷だけでなく、代謝物および転写産物の蓄積に明確な変動があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

(その他)

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: Ahmed Ali

ローマ字氏名: Ahmed Ali

研究協力者氏名: 川島 美香

ローマ字氏名: Kawashima Mika

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。